

Aus der Chirurgischen Klinik
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

**Autoradiographisch erfaßbare Veränderungen
der Regenerationszone der Dickdarmschleimhaut
der Ratte während der Cancerisierung
mit 1,2-Dimethylhydrazin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Dietrich Kröhl
aus Plauen

Mainz 1974

Aus der Chirurgischen Klinik
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

AUTORADIOGRAPHISCH ERFASSBARE VERÄNDERUNGEN DER
REGENERATIONSZONE DER DICKDARMSCHLEIMHAUT DER RATTE
WÄHREND DER CANCERISIERUNG MIT 1,2-DIMETHYLHYDRAZIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Dietrich Kröhl
aus Plauen

Mainz 1974



Dekan: Professor Dr. H. Langendorf

Referent: Professor Dr. H. Brünner

Korreferent: Professor Dr. E. Pross



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsangabe

I Einleitung

II Versuchsanordnung

A Methodik

- a) Experimentelle Cancerisierung mit 1,2-DMH
- b) Autoradiographie und Dipping-Technik
- c) ^3H -Index und Generationszeit

B Durchführung

- a) Allgemeines
- b) Versuchsgruppen
 1. Normalschleimhaut
 2. Proliferierende Schleimhaut
 3. Polypen
 4. Carcinome

III Ergebnisse

1. Normalschleimhaut
2. Proliferierende Schleimhaut
3. Polypen
4. Carcinome

IV Diskussion

1. Normalschleimhaut
2. Proliferierende Schleimhaut
3. Polypen
4. Carcinome
5. Allgemeines

V Zusammenfassung

VI Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Es gilt als gesichert, dass Colonicarcinome nicht direkt aus histologisch unveränderter Schleimhaut, sondern entweder aus Polypen oder auf dem Boden von Schleimhautbezirken mit verstärkter Proliferation entstehen (37, 39, 44). Da allen diesen Geweben eine verstärkte Proliferation zu eigen ist, wäre eine objektive Erfassung von Unterschieden oder Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer Proliferation und der Vergleich mit der Normalschleimhaut aufschlussreich, weil nach den bisher vorliegenden Ergebnissen eine maligne Entartung eine vorangehende Proliferation voraussetzt.

Mit Hilfe der radioaktiven Markierung von Zellkernen in der DNS-Synthese-Phase durch ^3H -Thymidin ist es nun möglich, das Mass der Proliferation eines Gewebes anhand der Markierungsdichte über den Zellkernen zu bestimmen (24, 30) und im Autoradiogramm aufzuzeigen.

In den vorliegenden Untersuchungen soll mit dieser Methode der Versuch gemacht werden, die Proliferationsintensität von proliferierender Schleimhaut, von Polypen, von Carcinomen und von normaler Colonschleimhaut zu bestimmen und zu vergleichen.

II. Versuchsanordnung

A Methodik

a) Experimentelle Cancerisierung mit 1,2-Dimethylhydrazin

Um eine experimentelle Cancerisierung bei Versuchstieren durchzuführen, wurden in den letzten Jahren zunehmend auch Hydrazinderivate verwandt.

So beobachtete Biancificori (2) Lebertumoren bei Mäusen nach täglicher oraler Gabe von 1,13 mg Hydrazinsulfat. Druckrey (10) erzielte Tumoren bei Ratten mit Hilfe von 1,2-Diäthylhydrazin. Bei Hamstern wurden nach i. m. Injektionen von 4,3 mg 1,2-Dimethylhydrazin Carcinome in Leber und Darm hervorgerufen (27). Bei Ratten beschreibt Schauer (35) das Auftreten von Neoplasmen nach wöchentlich verabreichten s. c. Dosen von 10 - 40 mg 1,2-Dimethylhydrazin/kg Körpergewicht des Versuchstieres. Auch Wiebecke (42) erzielte bei Mäusen Colonpolypen und -carcinome durch wöchentliche s. c. Injektionen von 1,2-Dimethylhydrazin in 0,35 %iger, auf pH 6,5 eingestellter wässriger Lösung in Einzeldosen von 15 mg/kg Körpergewicht des Versuchstieres. Tumoren traten hier be-

vorzugt im Gastrointestinaltrakt auf. Ähnlich beschreibt Springer (37) das Auftreten von Adenocarcinomen im Ratten-colon innerhalb von 10 - 16 Wochen nach dem Beginn einer wöchentlichen s. c. Gabe von 21 mg 1,2-Dimethylhydrazin/kg Körpergewicht. Auch Evans (13) beobachtete eine experimentelle Cancerisierung bei Mäusen mit Hilfe von 1,2-Dimethylhydrazin.

Allgemein scheint zu gelten, dass nach einer Gesamtdosis von 300 mg 1,2-Dimethylhydrazin/kg Körpergewicht und einer Inkubationszeit von 200 Tagen regelmässig Tumoren entstehen (20).

1,2-Dimethylhydrazin in seiner ursprünglichen Form ist wahrscheinlich nicht in der Lage, Neoplasmen hervorzurufen, sondern es bedarf erst noch einer "metabolischen Aktivierung" (11). Als Beweis hierfür wird gewertet, dass an den Injektionsstellen in keinem Falle Primärtumoren entstanden (11). Vielmehr wird das 1,2-Dimethylhydrazin nach Wittig (43) und Weisburger (39) erst zum Azomethan und dann weiter zum Azoxymethan oxydiert und stellt dann vermutlich die praeaktivierte Wirkform des 1,2-Dimethylhydrazins dar (44). Azomethan und Azoxymethan wirken viel stärker carcinogen als 1,2-Dimethylhydrazin, sind aber auch ungleich toxischer (44), so dass wir bei unseren eigenen Versuchen dem weniger toxischen

1,2-Dimethylhydrazin den Vorzug gaben. Die weiterfolgende oxydative Demethylierung des Azoxymethans durch spezifische Enzyme stellt den bedeutsamsten Schritt für die carcinogene Wirkung dar (44). Er findet nach Weisburger (39) im endoplastischen Reticulum der Leber mit Hilfe von Enzymen statt. Das oxydativ demethylierte Azoxymethan wird dann weiterhin durch ein Enzymsystem mit β -Glucuronsäure verbunden und gelangt über die Galle in den Darm. Dort wird es durch eine β -Glucuronidase wieder abgespalten (39). Das nun entstandene Methylazoxymethanol zerfällt spontan und führt über weitere instabile Zwischenstufen entweder zum Diazomethan oder direkt zum Methyl-Karbonium-Ion, den eigentlichen alkylierenden Agentien (44).

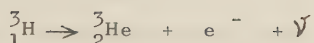
Abb. 1 zeigt den Abbau des 1,2-Dimethylhydrazins im Organismus (39).

b) Autoradiographie und Dipping-Technik

Die radioaktive Markierung einer Substanz erlaubt auf hervorragende Weise, ihre Wanderung in einem Organismus nachzuverfolgen, sie mit einfachen Mitteln wieder aufzufinden und sie von anderen Substanzen zu unterscheiden.

Um Einblick in die biochemischen Abläufe im Zellkern bei der DNS-Synthese zu bekommen, bedient man sich u. a. der Methode, der Zelle radioaktiv markiertes Thymidin für die DNS-Synthese anzubieten. Dieses Verfahren wird häufig angewandt und in der Literatur geschildert (1, 14, 17, 18, 19, 21, 25, 36). Thymidin ist für derartige Versuche besonders geeignet, da es nahezu ausschliesslich in der Zell-DNS eingelagert wird und so spezifisch eine Beobachtung der Vorgänge um die DNS zulässt (18). Da Thymidin, bzw. das radioaktiv markierte ^3H -Thymidin, ausserdem nur in der DNS solcher Zellkerne eingebaut wird, die sich zum Zeitpunkt seiner Verabreichung in der DNS-Synthese-Phase (S-Phase) befinden, lässt die Zahl der ^3H -Thymidin-markierten Zellen auf die Grösse der Proliferation schliessen. Dieses Verfahren findet vielfach bei der Tumor-Diagnostik Verwendung (14, 26).

Markiert wurde das ^3H -Thymidin mit dem instabilen Isotop des Wasserstoffs, Tritium. Tritium, das im Kern zwei Neutronen und ein Proton besitzt, verwandelt beim Bemühen um eine stabilere Form ein Neutron in ein Proton und wird zum Helium. Dabei werden ein negativ geladenes Elektron und ein Neutrino freigesetzt. Die Energie, die beim Zerfall des Protons auftritt, beschleunigt das Elektron und das Neutrino, wobei das erstere durch diesen Vorgang zur β -Strahlung wird (3).



Zerfall des Tritiums in Helium mit Freiwerden eines Elektrons und eines Neutrinos (3).

Die Möglichkeit einer Wertverfälschung, und zwar durch Transmethylierung mit dem Tritium-Atom auf Proteine, ist auszuschliessen, da für diesen Vorgang lange Expositionszeiten notwendig sind (4).

Die mittlere Reichweite der β -Strahlung beträgt etwa 2 μ (8). Bringt man nun in diesen Bereich einen Film oder eine fotoempfindliche Emulsion, so wird dieser bzw. diese belichtet, und man erhält ein Autoradiogramm. Nach Rogers (31) liegt der Vorteil der Autoradiographie anderen Verfahren gegenüber darin, dass sie durch den engen Kontakt einer fotografischen Emulsion mit biologischem Material Informationen liefert, die auf keinem anderen Wege geliefert worden wären.

Bei der Herstellung eines Autoradiogrammes geht man folgendermassen vor: In der Dunkelkammer wird bei dunklem Rotlicht die Filmemulsion in einem Becherglas mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1 gemischt und im Wasserbad von 45° C erwärmt, bis sich die Emulsion gleichmässig verdünnt hat. Man sollte eine Emulsion wählen, die je nach Verwendungszweck fein-

oder grobkörnig ist. Der feinkörnige Film eignet sich vor allem zur Bestimmung der genauen Anzahl der Silberkörner, während der grobkörnige Film eine deutliche Markierung der Zelle für die reine Indexbestimmung liefert. Um eine Blasenbildung zu vermeiden, ist möglichst auf ein Umrühren zu verzichten. Die Objektträger werden nun mit dem Ende, auf dem die Objekte lagern, in die Emulsion eingetaucht, bis sie deckfarbenweiss mit der Emulsion beschichtet sind. Man erhält so eine gleichmässige Deckschicht über dem Präparat. Dieses Vorgehen wird als Dipping-Technik bezeichnet (23). Anschliessend werden die Objektträger waagrecht in Färbeküvetten geschoben, die auf ihrer Längsseite lagern, und so in einen dunklen Trockenschrank gebracht. Nach dem Trocknen werden die Präparate in einem lichtdichten Behälter für die gewünschte Zeit bei 4°C exponiert (16). Hierauf werden sie entwickelt und fixiert.

c) ^3H -Index und Generationszeit

Auf dem Wege von einer zur nächsten Zellteilung durchläuft eine Zelle mehrere Teilphasen. Das folgende Beispiel zeigt den Generationszyklus einer Zelle in seinen Teilphasen (19).



M : Mitose-Phase

G₁ : Praesynthetische Ruhepause

S : DNS-Synthese-Phase

G₂ : Postsynthetische Ruhephase

Generationszeit: Teilungsfrequenz der Zelle in der berechneten Zeit

Nach diesem Schema durchlaufen die Zellkerne nach der Mitose zuerst die G₁-Phase und verdoppeln danach in der S-Phase ihre DNS. Von dort gelangen sie in die G₂-Phase und treten danach wieder in die nächste Mitose-Phase ein (19, 38). Injiziert man nun ³H-Thymidin, so markiert man die Kerne, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befinden (38). Wie nun Koburg (19) am Jejunum der Maus aufzeigt, steigt nach der ³H-Thymidin-Injektion die mittlere Silberkornzahl über den Interphasenkernen des Jejuns zunächst steil mit zunehmender Versuchsdauer an und erreicht nach 40 Minuten einen konstanten Wert.

Diese Zeitspanne entspricht der Verfügungszeit des Thymi-

dins. Man versteht darunter den Zeitintervall, in dem von Injektion des ^3H -Thymidins an gerechnet ^3H -DNS gebildet wird (19). Da bereits 50 Minuten nach der Injektion markierte Telophasen auftraten (19), sollte man die Versuchstiere gemäss dieser Verfügungszeit töten, da bei einem längeren Zeitintervall die Gefahr besteht, dass man Zellkerne mitzählt, die die G_2 -Phase bereits durchlaufen haben und sich in der Mitose-Phase befinden. Cameron (6) setzt die Verfügungszeit des ^3H -Thymidins bei 45 Minuten fest. Er hält es auch nach diesem Zeitraum für höchst unwahrscheinlich, dass ein Zellkern markiert wurde und bereits die Mitose beendet hat. Er tötete deshalb die Versuchstiere 45 Minuten nach der ^3H -Thymidin-Injektion.

Zählt man nun in einem Präparat die markierten Zellkerne und stellt sie der Gesamtzahl gegenüber, so lässt sich daraus der ^3H -Index errechnen. Mit seiner Hilfe ist es möglich, die Proliferationsintensität eines Gewebes zu objektivieren.

$$^3\text{H}\text{-Index \%} = \frac{\text{Zahl markierter Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Formel zur Berechnung des ^3H -Index (15).

Der ^3H -Index erlaubt weiterhin Rückschlüsse auf Wachstumsgeschwindigkeit und Generationszeit. Nach der folgenden Formel ist es nun möglich, die Generationszeit zu berechnen, wenn die Dauer der S-Phase und der ^3H -Index bekannt sind (15)

$$\frac{\text{Zahl markierter Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}} = {}^3\text{H-Index}\% = \frac{\text{S-Phase (Dauer)}}{\text{Generationszeit (Dauer)}}$$

Hierbei verhält sich die Anzahl der markierten Zellen zur Gesamtzellzahl wie die Dauer der DNS-Neubildung zur Generationszeit. Da Pilgrim (28) und Schauer (34) berichten, dass auch bei verschiedenen Generationszeiten die S-Phasen annähernd gleiche Werte haben, erlaubt die oben aufgeführte Formel, die Generationszeiten verschiedener Gewebe zu errechnen und so Aufschluss über ihre Wachstumsgeschwindigkeit zu erhalten. Eine Verkürzung der Generationszeit bei gleich langer Dauer der S-Phase und der G_2 +M-Phasen wird durch die Verkürzung der G_1 -Phase erreicht, da die S-, G_2 +M-Phasen beim erwachsenen Tier überall den gleichen Wert zu haben scheinen. Die grossen Unterschiede der Generationszeiten müssen also im wesentlichen durch grosse Unterschiede der G_1 -Phase zustandekommen (28). Auch Dörmer (9) berichtet, dass die S-Phase in einem Carcinom annähernd gleich blieb und die G_1 -Phase verkürzt war. Er schreibt, dass die Lebensdauerverkürzung fast ausschliesslich auf

Kosten der G_1 -Phase gehe. Pilgrim (28) zeigt anhand von 30 Zellarten unterschiedlicher Herkunft, dass die S-Phase (bei verschiedenen Generationszeiten) den gleichen Wert hat, im Durchschnitt 7,5 Stunden. Die gilt sowohl für die Ratte als auch für die Maus.

Einige Beispiele von 3H -Index, S-Phase und Generationszeit aus der Literatur:

Art	3H %	S [h]	Gen.Zeit [h]	Literatur
<u>Maus:</u>				
Platten- epith.Ca	30	8	32	Dörmer (9)
norm.Haut	2-4	6-7	150	Dörmer (9)
<u>Ratte:</u>				
Zungen- epith.		7,7		Pilgrim (28)
Magen- epith.		7,8		Pilgrim (28)
Colon-Krypt.- Epith.		7,8-8,1		Pilgrim (28)
Colon-Ca	37,5 $\pm$ 4,1	7,9	21,4	Schauer (34)
umgeb. Schleimh. d. Ca	23,9 $\pm$ 3,1	8,0	32,3	Schauer (34)
Colon	12,7			Messier (24)
Colon	23,0			Cameron (6)

B Durchführung

a) Allgemeines

Als Versuchstiere dienten zwei Gruppen von männlichen Wistar-ratten mit einem Ausgangsgewicht von 150 - 200 g. Den Tieren der ersten Gruppe wurde im Abstand von sieben Tagen jeweils 1,2-Dimethylhydrazindihydrochlorid in wässriger, auf pH 6,5 eingestellter Lösung s. c. injiziert, und zwar 21 mg/kg Körpergewicht. Dies wurde 13 - 25 Wochen lang durchgeführt. Die Versuchstiere durchliefen das Stadium der Entzündung, der verstärkten Proliferation und entwickelten anschliessend in nahezu gleichem Abstand Polypen und Carcinome. Der Zeitpunkt der Ausbildung der neoplastischen Veränderungen zeigte allerdings eine starke individuelle Schwankungsbreite.

Eine zweite Gruppe von Versuchstieren wurde über die gleiche Zeit unter den gleichen Bedingungen gehalten, nur wurde ihr kein 1,2-Dimethylhydrazindihydrochlorid injiziert.

Beide Gruppen wurden frei von pathogenen Keimen in Kunststoffkäfigen gehalten und mit Altrone-R gefüttert, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Nach 13 - 25 Wochen wurde den Tieren beider Gruppen jeweils

1 mCi/kg Körpergewicht ^3H -Thymidinmethyl mit einer Aktivität von 54,2 Ci/mMol in die Bauchorta injiziert. Zwar injizierten einige Autoren (19, 38) bei ähnlichen Versuchen i. p., wir jedoch sahen hiervon ab. Dadurch vermieden wir, dass durch das Peritoneum unterschiedlich resorbiert wurde und konnten so den Zeitraum von 45 Minuten als Verfügungszeit für die Zelle genauer gewährleisten. - Es wurde ^3H -Thymidin der Firma New England Nuclear, Boston, Mass., verwandt.

Entsprechend der von Cameron (6) angezeigten Verfügungszeit von ^3H -Thymidin töteten wir die Tiere 45 Minuten nach Injektion des ^3H -Thymidinmethyls und liessen sie ausbluten. - Da in der Literatur Hinweise auf eine physiologische Schwankung der Proliferation in Abhängigkeit von der Tageszeit existieren (29), wurden die Tiere immer zur gleichen Tageszeit getötet. - Daraufhin wurde ihnen das Colon entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und gesäubert und unmittelbar danach in gepuffertem neutralem 4 %igen Formalin kurz anfixiert. Anschliessend wurden die Därme in zwei Teilen aufgewickelt, um sie in ihrer gesamten Länge zu erfassen. Hierauf fixierten wir die Präparate 48 Stunden lang bei 4°C und brachten sie dann nacheinander in eine aufsteigende Alkoholreihe, in Methylbenzoat und in Benzol. Nach dieser Behandlung kamen sie in eine aufsteigende Paraffin-Reihe.

und wurden anschliessend in Paraffin eingegossen. Nach dem Härten wurden mit dem Mikrotom 5 μ dicke Schnitte angefertigt, um nach Möglichkeit nur eine Zellebene zu erfassen. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad von 34 - 38° C gestreckt und auf mit Eiweiss-Glycerin beschichtete Objektträger aufgezogen. Diese Vorbehandlung der Objektträger sollte eine Ablösung der Präparate vermeiden. Auf jeden Objektträger kamen jeweils die linke und die rechte Hälfte eines Colons. Damit wollten wir erreichen, dass für beide Hälften des Darmes gleiche Verhältnisse bestanden. Die Präparate wurden nun mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Jetzt beschichteten wir sie nach der Dipping-Technik (23) mit der Emulsion G 5 der Firma Ilford, Ilford, Essex, und exponierten sie 11 Tage lang trocken in einem lichtfreien Raum bei 4° C. Nach Ablauf dieser Zeit entwickelten wir sie 6 Minuten bei 20° C mit Kodak D 19-Entwickler und fixierten sie 10 Minuten mit sauerem Fixiersalz von Agfa und nahmen anschliessend eine H-E-Färbung vor. Schliesslich wurden die Objekte mit Caedax eingedeckt und mit Deckgläschen geschützt. In der geschilderten Technik stützten wir uns auf Burck (5), Romeis (32) und Rogers (31).

Da von jedem Objekt mindestens sechs Schnitte angefertigt worden waren, konnten wir diejenigen aussuchen, die neben guter technischer Qualität einwandfrei pathologische Befun-

de und eine exakte Auszählung zuliessen. Von jedem Tier wurde jeweils ein Schnitt verwandt, ausgezählt wurde mit einem Zeiss-Mikroskop mit der Vergrößerung 500.

b) Versuchsgruppen

Nach pathologischen Befunden geordnet, konnten wir das angefallene Material in folgende Gruppen einordnen:

1. Kontrollgruppe

Präparate von 10 Tieren, bei denen keine experimentelle Cancerosisierung mit 1,2-Dimethylhydrazindihydrochlorid durchgeführt wurde, bildeten die Kontrollgruppe. Hier wurde jeweils in den vorderen und hinteren Colanhälften das Epithel von jeweils 3 Krypten von der Basis bis zur Schleimhautoberfläche ausgezählt.

2. 10 Präparate mit Zonen von proliferierender Schleimhaut

Hier wurden jeweils 300 Zellen pro Präparat ausgezählt oder soviel mehr als 300, dass charakteristische Kriptenstrukturen bis zum Ende ausgezählt werden konnten.

3. Gruppe mit 16 Polypen

Auch hier wurden jeweils 300 Zellen pro Präparat ausgezählt oder so viel mehr als 300, dass charakteristische vorhandene Kryptenstrukturen bis zum Ende ausgezählt werden konnten. In unserem Versuch entwickelten sich in der Mehrzahl adenomatöse Polypen, doch beobachteten wir auch vereinzelt Zottenpolypen.

4. Gruppe mit 12 Carcinomen

a) Bei den Carcinomen wurden jeweils 300 Zellen in Regionen mit invasivem Tumorwachstum gezählt. Diese waren im Autoradiogramm anhand der inselartig gehäuft auftretenden Silberkörnchen gut auszumachen.

b) Weiterhin zählten wir jeweils 300 Zellen in Regionen, in denen nur eine geringe Anzahl von markierten Zellen zu sehen und das Gewebe bereits überwiegend stark ausdifferenziert war. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Zählung nicht in nekrotischem Gewebe stattfand.

III. Ergebnisse

1. Normalschleimhaut (siehe Bild 1)

Das histologische Bild der Normalschleimhaut zeigte zahlreiche Markierungen im unteren Drittel der Krypten, wobei sich ihr Maximum bis auf $1/4$ erstreckte und dann bis auf $1/3$ Kryptenhöhe allmählich weniger wurde. Vereinzelt waren markierte Zellen sogar bis zur Kryptenmitte zu erkennen. Das Epithel war in allen Abschnitten einreihig, die Kerne des Zylinderepithels rund bis stäbchenförmig. Becherzellen, mit ihren meist an den Zellwänden flach anliegenden Kernen, waren auf dem Kryptenboden relativ häufig, kamen dann im Proliferationsmaximum etwas seltener vor und wurden zum Kryptenausgang hin wieder zahlreicher. Auf dem Kryptenboden direkt war bei einigen Präparaten die Silberkorndichte nicht so gross wie unmittelbar darüber.

Bei der Auszählung der Präparate erhielten wir für den ^3H -Index einen Mittelwert von 17 %. Die Einzelergebnisse sind in Abb. 2 aufgezeigt. Nach der Formel von Fettig (15) ergibt sich, bei einer angenommenen DNS-Synthese-Zeit von 8 Stunden, eine Generationszeit von etwa 47 Stunden für die Normalschleimhaut.

2. Proliferierende Schleimhaut (siehe Bild 2)

Bei der proliferierenden Schleimhaut bemerkten wir verstärkt markierte Zellkerne. Die Markierungen waren hier nicht mehr nur auf das untere Drittel der Kryptenabschnitte beschränkt, sondern sie erstreckten sich z. T. über die gesamte Schleimhautdicke. Hierbei hatte sich das proliferierende Maximum z. T. bis knapp unter die Schleimhautoberfläche verschoben. Vereinzelt waren die Krypten leicht geschlängelt und unruhig. Auch in diesen Bereichen bemerkten wir verstärkt Markierungen. Becherzellen waren in den Proliferationsmaxima fast nicht aufzufinden.

Die Auszählung der 10 proliferierenden Schleimhautbezirke ergab einen ^3H -Index von 42 % im Mittelwert. Die Einzelergebnisse sind in Abb. 3 aufgeführt. Nach der Formel von Fetting (15) ergibt sich, bei einer angenommenen DNS-Syntheszeit von 8 Stunden, eine Generationszeit von etwa 19 Stunden für die proliferierende Schleimhaut.

3. Polypen (siehe Bild 3)

Bei den adenomatösen Polypen waren die Krypten an der Basis nahezu normal und wurden dann zur Oberfläche hin unruhig. Die Kryptenlumina erschienen in einigen Fällen erweitert und geschlängelt. Die Epithelien waren einreihig und die proliferierenden Maxima lagen nahe unter der Polypenober-

fläche. Die villösen Polypen hatten z. T. stark verlängerte Kryptenschläuche und bildeten verzweigte, fächerartige Strukturen. Erweiterungen der Lumina waren in keinem Fall vorhanden. Die Epithelien waren einreihig, und die proliferierenden Maxima befanden sich nahe an der Schleimhautoberfläche.

Bei der Auszählung der Präparate erhielten wir für den ^3H -Index einen Mittelwert von 46 %. Die Einzelergebnisse sind in Abb. 4 aufgezeigt. Nach der Formel von Fettig (15) errechnet sich, bei einer angenommenen DNS-Synthese-Zeit von 8 Stunden, eine Generationszeit von 17 Stunden für die Polypen.

In Abb. 7 sind die ^3H -Indices der Polypen ihrer Häufigkeit nach aufgezeichnet und denen der Carcinome gegenübergestellt

4. Carcinome (siehe Bild 4)

Es entwickelten sich in unserer Versuchsanordnung im Dickdarm ausschliesslich Adenocarcinome in verschiedenen Stufen der Ausdifferenzierung. Einerseits fanden wir in einigen Carcinomen Strukturen, die an Drüsenschläuche erinnerten. Die Epithelien waren hier ein- oder mehrreihig, füllten die zentrale Lichtung z. T. völlig aus und wiesen viele Markie-

rungen auf. Andererseits erhielten wir schleimbildende Carcinome. Der Schleim sammelte sich hier in den Hohlräumen und zwischen Epithel und Bindegewebe. Wir beobachteten stark proliferierende, zusammenhängende Epithelien als auch inselartige Epithelreste, die sich inmitten der gallertartigen Massen befanden. Auch hier hatten die proliferierenden Zonen eine verstärkte Markierungsdichte aufzuweisen. Vereinzelt fanden sich auch Siegelringzellen. Mengenmässig überwog die Gallertmasse meistens stark, so dass im histologischen Bild eine sehr grosse Gallertfläche mit sehr wenig Markierungen einer relativ kleinen, stark markierten Wachstumszone gegenüber stand. In einigen Präparaten beobachteten wir Mischformen der hier geschilderten Stadien, d. h. wir fanden sowohl kryptenartige als auch schleimige Formen gemeinsam nebeneinander. Die Malignität wurde dann als gegeben angenommen, wenn ein invasives Wachstum stattfand. So beobachteten wir ein Vordringen der entarteten Gewebe in die Muscularis mucosae und teilweise in die Muscularis propria.

Bei der Auszählung der markierten Zellkerne erhielten wir für den ^3H -Index einen Mittelwert von 41%. Die Einzelergebnisse sind in Abb. 5 aufgezeigt. Nach der Formel von Fettig (15) errechnet sich, bei einer angenommenen DNS-Synthese-Zeit von 8 Stunden, eine Generationszeit von 20 Stun-

den für die Wachstumszonen der Carcinome. Bei der Auszählung der Zonen mit minimalem Wachstum kamen wir auf einen Mittelwert von 7 % für den ^3H -Index, was einer Generationszeit von 118 Stunden entspricht. Die Einzelergebnisse und die ^3H -Indices sind aus Abb. 5 zu ersehen.

Abb. 7 zeigt vergleichsweise die ^3H -Indices der Polypen und der Carcinome. In Abb. 8 sind die ^3H -Indices der Wachstumsmaxima und der Wachstumsminima der Carcinome miteinander verglichen.

Gewebe	^3H -Index mit Standardabw. [%]	mittlere Generationszeit [h]
Normalschleimhaut	17 $\pm$ 4	47
Prolif. Schleimhaut	42 $\pm$ 7	19
Polyp	46 $\pm$ 8	17
Ca max.	41 $\pm$ 4	20
min.	7 $\pm$ 3	114

Mit den Nummern 1 - 10 der 4 verschiedenen untersuchten Gewebsarten wurde ein multipler Vergleich nach Nemenyi zum Vergleich der ^3H -Indices durchgeführt (33); siehe Abb. 6. Bei den Carcinomen wurden hierfür die Werte der Maxima verwandt.

Das Ergebnis zeigt eine signifikante Proliferationssteigerung von der normalen Schleimhaut zu der proliferierenden Schleimhaut, zu den Polypen und zu den Carcinomen (Irrtumswahrscheinlichkeit = 1 %).

Bei der Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen stützten wir uns auf Campbell (7).

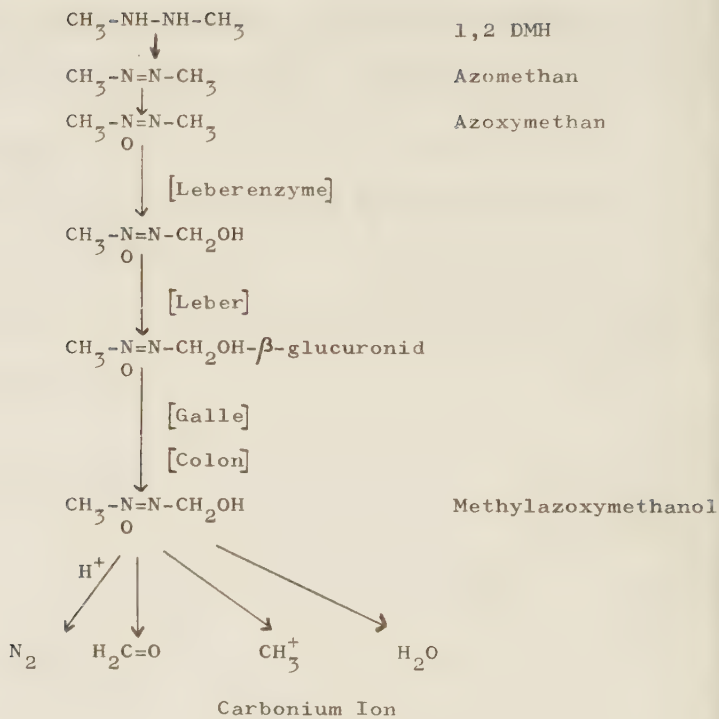


Abb. 1: Abbau des 1,2-DMH im Organismus nach Weisburger (39)

Abb. 2:

Die folgenden Werte wurden an der Normalschleimhaut ermittelt.

Präparat-Nr.	Gesamtzellzahl/Markierte	^3H -Index%
N 1	925/169	18
N 2	742/117	16
N 3	680/158	23
N 4	765/ 94	12
N 5	680/131	19
N 6	810/121	15
N 7	715/158	22
N 8	685/114	15
N 9	835/177	21
N 10	705/124	18

Die ^3H -Indices wurden jeweils auf die letzte Stelle vor dem Komma auf- bzw. abgerundet.

Abb. 3:

Die folgenden Werte wurden an proliferierender Colonschleimhaut ermittelt.

Präparat-Nr.	Gesamtzellzahl/Markierte	^3H -Index%
S 1	300/116	39
S 2	300/141	47
S 3	300/132	44
S 4	300/121	40
S 5	300/107	36
S 6	300/128	43
S 7	300/159	53
S 8	300/117	39
S 9	300/ 89	30
S 10	300/150	50

Die ^3H -Indices wurden jeweils auf die letzte Stelle vor dem Komma auf- bzw. abgerundet.

Abb. 4:

Die folgenden Werte wurden an Polypen ermittelt.

Präparat-Nr.	Gesamtzellzahl/Markierte	^3H -Index%
P 1	310/183	59
P 2	310/105	34
P 3	310/136	44
P 4	300/151	50
P 5	330/135	41
P 6	300/139	46
P 7	330/115	35
P 8	300/171	57
P 9	310/163	53
P 10	305/115	38
P 11	300/119	40
P 12	300/151	50
P 13	310/137	44
P 14	300/165	55
P 15	300/131	44
P 16	300/129	43

Die ^3H -Indices wurden jeweils auf die letzte Stelle vor dem Komma auf- bzw. abgerundet.

Abb. 5:

Die folgenden Werte wurden an Carcinomen ermittelt.

M a x i m a

M i n i m a

Präp. Ges.Zell-
Nr. zahl /Mark. ^3H -Index%

Ges.Zell-
zahl /Mark. ^3H -Index%

C 1	330/134	41	300/30	10
C 2	300/129	43	300/17	6
C 3	300/203	68	300/22	7
C 4	300/150	50	300/17	6
C 5	300/130	43	300/19	6
C 6	300/ 90	30	300/18	6
C 7	300/143	48	300/ 5	2
C 8	300/121	40	300/12	4
C 9	300/ 66	22	300/21	7
C 10	300/102	34	300/24	8
C 11	300/100	33	300/40	13

Die ^3H -Indices wurden jeweils auf die letzte Stelle vor dem Komma auf- bzw. abgerundet.

Stichprobe der Standardwerte	12	15	15	16	18	18	19	21	22	23
Rang " "	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11
Stichprobe der proliferierten Schleimhaut	30	36	39	39	40	43	44	47	50	53
Rang " " "	12	17	19	20	22	25	29	31	34	37
Stichprobe der Polypen	34	35	38	41	44	46	50	53	57	59
Rang " "	14	16	18	24	28	30	35	36	38	39
Stichprobe der Carcinome	22	30	34	40	41	43	43	48	50	68
Rang " "	10	13	15	21	23	26	27	32	33	40

	Rangsumme	Differenz zur Rangsumme der Normalschleimhaut
normale Schleimhaut	56	
proliferierte Schleimhaut	246	190
Polyp	278	222
Carcinom	240	184

Abb. 6: Multipler Vergleich nach Nemenyi

Für die Stichproben wurden bei den Polypen und Carcinomen jeweils die Nummern 1 - 10 verwandt. Bei den Carcinomen wurde die Stichprobe anhand der Werte für die Wachstumsmaxima durchgeführt.

Beurteilung der Ergebnisse für den multiplen Vergleich nach Nemenyi: Kritischer Wert für die Differenzen der Rangsummen ist 162,8 (1 % Signifikanz-Niveau, Irrtumswahrscheinlichkeit gilt für alle möglichen Differenzen gleichzeitig).

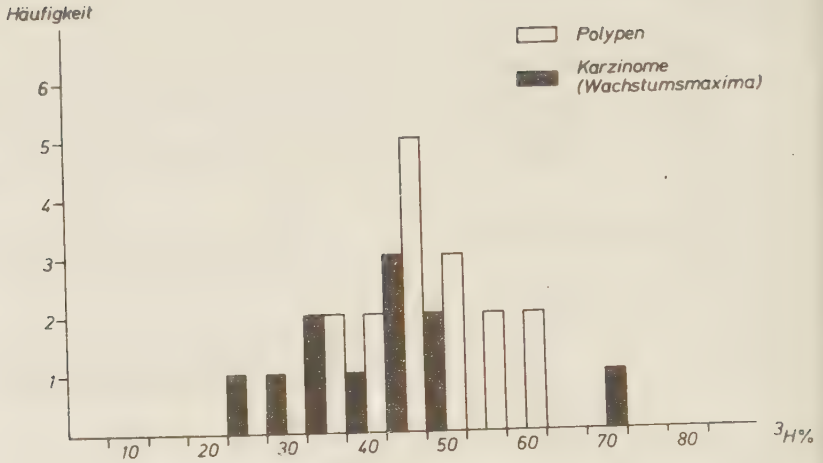


Abb. 7 zeigt die ^3H -Indices von 16 Polypen und den Wachstumsmaxima von 11 Carcinomen nach ihrer Häufigkeit.

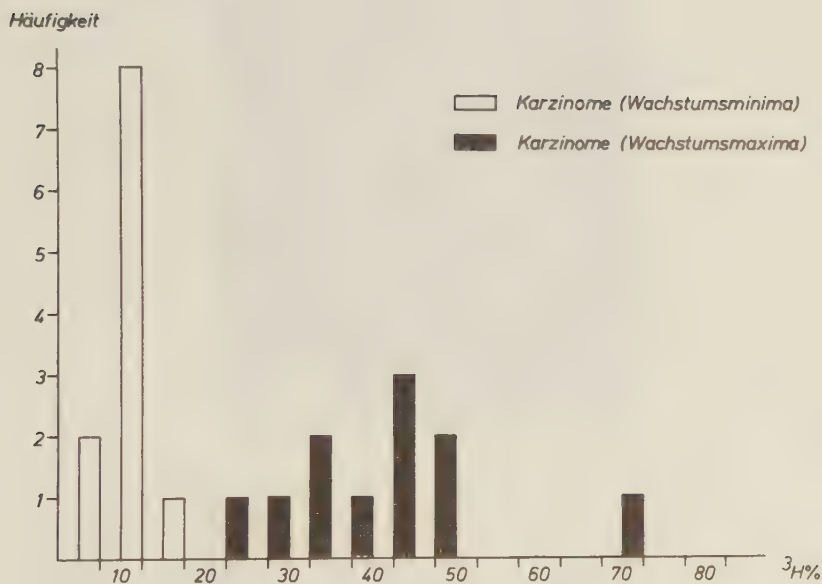


Abb. 8 zeigt die ^3H -Indices der Wachstumsmaxima und -minima von 11 Carcinomen nach ihrer Häufigkeit.

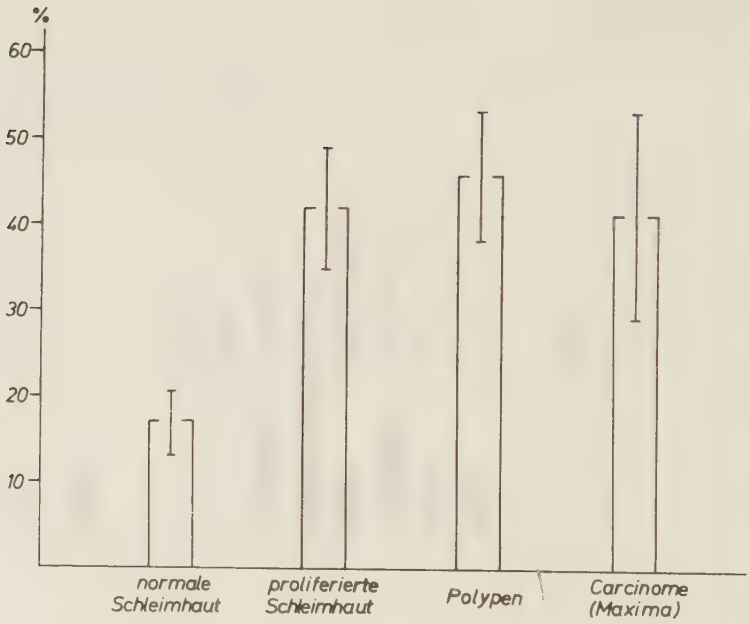


Abb. 9 zeigt die Mittelwerte der Normalschleimhaut, der proliferierenden Schleimhaut, der Polypen und der Carcinome mit ihren Standardabweichungen. Einzelwerte siehe Abb. 2 - 5.



Bild 1: Normalschleimhaut

Die Markierungen sind deutlich im unteren Drittel der Krypten zu erkennen

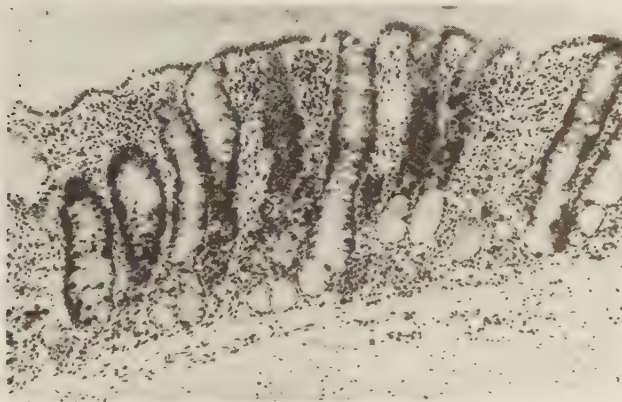


Bild 2: Schleimhaut mit verstärkter Proliferation

Der markierte Bereich ist deutlich verbreitert und zur Schleimhautoberfläche hin verschoben

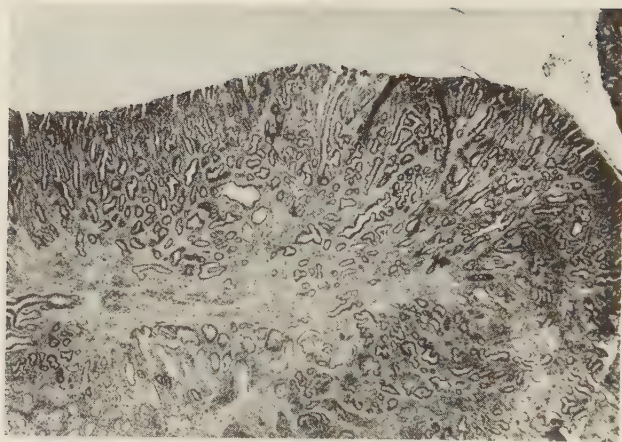


Bild 3: Adenomatöser Polyp mit verlagelter Regenerationszone

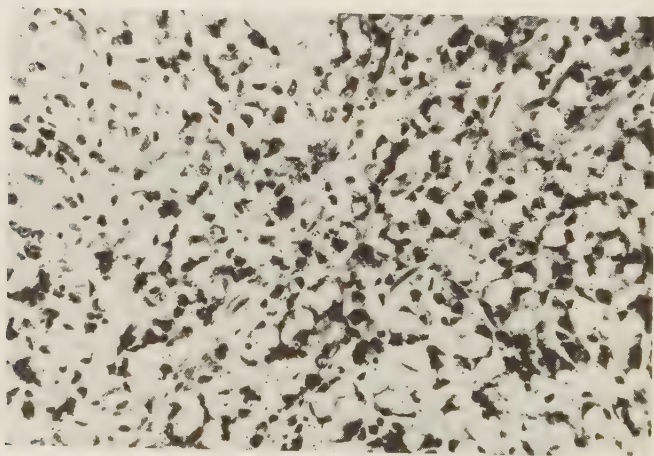


Bild 4: Gallert-Carcinom mit Siegelringzellen und Markierungen in der Wachstumszone

IV. Diskussion

1. Normalschleimhaut

Cameron (6) und Messier (24) ermittelten bei der Normalschleimhaut in eigenen Versuchen Mittelwerte von 23 % bzw. 12,7 % für den ^3H -Index. Wir selbst bestimmten einen Mittelwert von 17 %, wobei die Einzelergebnisse zwischen 23 % und 12 % schwankten. Entscheidend ist der deutlich prozentuale Anstieg, den wir von der Normalschleimhaut zu der proliferierenden Schleimhaut, den Polypen und den Carcinomen erhielten.

Das Maximum der Markierungen und somit die Lage der Regenerationszone lag bei der Normalschleimhaut in der Basis der Krypten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Messier (22) und Eder (12).

2. Proliferierende Schleimhaut

Die proliferierende Schleimhaut zeigte eine Verbreiterung mit einer Verlängerung der Kryptenstrukturen. Der proliferierende Bereich erstreckte sich nahezu über ihre gesamte Länge. Gleiches schildert auch Springer (37), der herdförmige Differenzierungsverluste mit einer Verbreite-

rung der Proliferationszone beobachtete, in der bei Verlust von Becherzellen bis zur Schleimhautoberfläche DNS-synthetisierende Zellen und Mitosen liegen. Der gefundene Wert von 42 % für den ^3H -Index liegt nahezu auf gleicher Höhe wie die Mittelwerte der Polypen und der Carcinome.

3. Polypen

Bei den Polypen waren 46 % der Zellkerne radioaktiv markiert. Dies ist der höchste Mittelwert, den wir bei unseren Untersuchungen überhaupt erhielten. Auch hier liessen die deutlich verbreiterten markierten Zonen auf eine stark gesteigerte Proliferation schliessen. Gleiches beobachtete auch Wiebecke (40), der eine praktisch über die gesamte Schleimhautdicke gehende Proliferationszone beschreibt, mit einer Verlagerung des Markierungsmaximums zur Oberfläche hin. Nach Krey (20) sind für die Entstehung von Polypen eine Verbreiterung der Proliferationszonen mit partiellem Differenzierungsverlust und eine Verlagerung der DNS-synthetisierenden Zellen an die Oberfläche notwendig. Dies konnten wir mit Hilfe der Autoradiographie bestätigen.

4. Carcinome

Die Auszählung der Wachstumszonen der Carcinome erbrachte

einen Mittelwert von 41 % für den ^3H -Index, der somit etwa in gleicher Höhe mit den Polypen der proliferierenden Schleimhaut lag. Ein Einzelwert jedoch lag über allen anderen bei 68 %, was einem besonders starken invasivem Wachstum entspricht. Der gefundene Mittelwert deckt sich nahezu mit dem von Schauer (34), der 37,5 % angibt und ebenfalls im Wachstumsmaximum zählte.

Auch im ausgereiften Teil des Gallert-Carcinoms findet man noch vereinzelt Zellen im Mitosestadium. D. h., zwischen den einzelnen Gallertzellen befinden sich noch einzelne, nicht ausdifferenzierte Zellen, die in der DNS-Synthese sind und Markierungen aufweisen, da auch beim Carcinom die differenzierten Zellen selbst nicht mehr an der Proliferation teilnehmen, wie Wiebecke (41) beim Duodenum-Carcinom aufzeigte. Als Erklärung hierfür mag gelten, dass die G_1 -Phase, in der sich normalerweise die Zellen ausdifferenzieren und dann die Teilungsfähigkeit verlieren, verkürzt ist. Da sich eine gesteigerte Proliferation vor allem auf Kosten der G_1 -Phase abspielt (34), kommt es hier im unreifen Gewebe zu Differenzierungsstörungen.

5. Allgemeines

Es wird eine signifikante Zunahme der ^3H -Indices von der Normalschleimhaut zur proliferierenden Schleimhaut, zum

Carcinom und zu den Polypen festgestellt (siehe auch Abb. 9). Die Tatsache, dass die drei letzteren hierbei nahezu die gleichen Ergebnisse haben, lässt den Schluss zu, dass der ^3H -Index nicht geeignet ist, einen Unterschied zwischen benignem und malignem Wachstum aufzuzeigen, sondern nur dazu dienen kann, den Proliferationsgrad eines Gewebes zu bestimmen. Gleichwohl scheint dieser einen Hinweis auf die potentielle Bereitschaft zur Entartung zu geben. Nach Meinung von Springer (37) ist eine erhöhte Proliferation Vorbedingung für eine Entartung. Auch Weisburger (1) schildert, dass eine Entdifferenzierung und eine gesteigerte Proliferation Vorbedingung sind für das Entstehen eines Carcinoms. Wittig (44) schildert die Entstehung von Spontancarcinomen unmittelbar aus der proliferierenden Schleimhaut. Krey (20) wiederum beobachtete, dass durch eine Steigerung der Proliferation und eine Verlagerung der DNS-synthetisierenden Zellen in die oberen Schleimhautbezirke adenomatöse Polypen entstehen. Bei allen diesen Formen findet sich eine verstärkte Proliferation, die sich in einem partiellen Differenzierungsverlust des Kryptenepithels mit Verlagerung der DNS-synthetisierenden Zellen in die oberen Schichten und einer verstärkten Mitose-Aktivität mit einer Verringerung der Anzahl von Becherzellen äussert (37). Auch der Vergleich der Mittelwerte der ^3H -Indices der proliferierenden Schleimhaut, der Polypen und der Carcinome ergibt,

dass diesen ein Stadium erhöhter Proliferation gemeinsam ist, dass sie einen nahezu gleichen ^3H -Index haben und eine nahezu gleich hohe Zellerneuerungsrate. Der Entstehungsmechanismus führt zunächst zur gesteigerten Proliferation und bei weiterer Verabreichung des Carcinogens zu Polypen und Carcinomen. Ob die Gewebe mit verstärkter Proliferation allerdings entarten, ist davon abhängig, dass die genetische Information in den Zellkernen geändert wird (43).

Die Lokalisation der Markierungen und die gemessenen ^3H -Indices sind Hinweise, dass in der proliferierenden Schleimhaut die gleichen Veränderungen der Regenerationszone ablaufen wie in der Schleimhaut der Polypen. Dies erklärt, dass Carcinome sowohl aus der makroskopisch unveränderten, aber proliferierenden Schleimhaut als auch aus der Polypenschleimhaut entstehen.

V. Zusammenfassung

Männliche Wistarratten erhielten eine wöchentliche Dosis von 21 mg/kg Körpergewicht 1,2-Dimethylhydrazindihydrochlorid s. c. injiziert. Nach 13 - 25 Wochen wurden sie 45 Minuten nach i. a. Injektion von ^3H -Thymidinmethyl getötet. Die histologische Untersuchung der Dickdärme erlaubte die Einteilung des Materials in folgende Gruppen: 10 Bereiche mit proliferierender Schleimhaut, 16 Polypen und 11 Carcinome. Bei allen drei Gruppen war eine gesteigerte Proliferation mit Entdifferenzierung festzustellen. Dies äusserte sich einerseits in der Verlagerung und der Verbreiterung der Regenerationszonen zur Oberfläche hin und andererseits durch eine stark erhöhte Mitose-Aktivität, was mit Hilfe der ^3H -Thymidin-Markierung der Zellkerne und der Dipping-Technik aufgezeichnet werden konnte. Die erhaltenen Mittelwerte der ^3H -Indices betrugen 42 % bei der proliferierenden Schleimhaut, 46 % bei den Polypen, 41 % in den Wachstumsmaxima der Carcinome und 17 % bei der unveränderten Normalschleimhaut, deren ^3H -Index anhand von 10 Präparaten von gesunden Tieren ebenfalls ermittelt wurde. Da demnach die Zellteilungsfrequenz und die Zellteilungsrate in der proliferierenden Schleimhaut, den Polypen und den Car-

cinomen nahezu gleich sind, stimmt dies mit der Beobachtung überein, dass Entartungen nur nach einer gesteigerten Proliferation und nach der Verlagerung der Proliferationszone stattfinden. Bei noch weiterer Einwirkung von Carcinogenen auf diese Bezirke kommt es dann, nach Änderung der genetischen Information in den Zellkernen, zur Entartung. Die Index-Steigerungen von der Normalschleimhaut zur proliferierenden Schleimhaut, zu den Polypen und zu den Wachstumsmaxima der Carcinome waren jeweils statistisch signifikant.

VI. Literaturverzeichnis

1. Bertalanffy, F. D.

Tritiated thymidine versus colchicine technique in the study of cell population cytodynamics

Lab. Invest. 13, 371 - 386 (1964)

2. Fiancifiori, C.

Hepatomas in CBA/Cb/Se mice and liver lesions in golden hamsters induced by hydrazine sulfate

J. nat. Cancer Inst. 44, 943 - 953 (1970)

3. Van der Borcht, O.

Basic nuclear aspects of autohistoradiography (with suggestions concerning color autoradiography)

Acta histochem. (Jena) Suppl. 8, 15 - 21 (1968)

4. Bryant, B. J.

The incorporation of tritium from thymidine into proteins of the mouse

J. Cell. Biol. 29, 29 - 36 (1966)

5. Burck, H.-Ch.

Histologische Technik

Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969

6. Cameron, I. L. und Greulich, R. C.
Evidence for an essentially constant duration of DNA
synthesis in renewing epithelia of the adult mouse
J. Cell. Biol. 18, 31 - 40 (1963)
7. Campbell, R. C.
Statistische Methoden für Biologie und Medizin
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971
8. Caro, L. G. und Schnoes, M.
Tritium and phosphorus-32 in high resolution
autoradiography
Science 149, 60 - 62 (1965)
9. Dörmer, P., Tulinius, H. und Oehlert, W.
Untersuchungen über die Generationszeit, DNS-Synthese-
zeit und Mitosedauer von Zellen der hyperplastischen Ep-
dermis und des Plattenepithelcarcinoms der Maus nach Me-
thylcholanthrenpinselung
Z. Krebsforsch. 66, 11 - 21 (1966)
10. Druckrey, H., Preussmann, P., Matzkies, F. und Ivankovi
Carcinogene Wirkung von 1,2-Diäthylhydrazin an Ratten
Naturwissenschaften 54, 285 - 286 (1967)

11. Druckrey, H., Preussmann, P., Matzkies, F. und Ivankovic, S.
Selektive Erzeugung von Darmkrebs bei Ratten durch
1,2-Dimethylhydrazin
Naturwissenschaften 54, 285 - 286 (1967)
12. Eder, M.
Zellerneuerungen im Magen-Darm-Trakt
Verh. dtsh. Ges. Path. 50, 75 - 90 (1966)
13. Evans, J. T., Lutman, G. und Mittelman, A.
The induction of multiple large bowel neoplasms in mice
J. Med. (Basel) 3, 212 - 215 (1972)
14. Fettig, O. und Oehlert, W.
Autoradiographische Stoffwechseluntersuchungen mit triti-
ummarkierten Substanzen an Tumorgeweben des menschlichen
Uterus
Radionukleide 5, 131 - 136 (1964)
15. Fettig, O. und Sievers, R.
³H-Index und mittlere Generationszeit des menschlichen
Portiocarcinoms und seine Vorstufen
Beitr. path. Anat. 133, 83 - 100 (1966)

16. Fischer, H. A. und Werner, G.
Autoradiographie
de Gruyter Verlag, Berlin 1971
17. Fliedner, T. M., Haas, R. J. und Stehle, H.
Die ^3H -Thymidinmarkierung aller Zellkerne neugeborener Ratten
Acta histochem. (Jena) Suppl. 8, 231 - 256 (1968)
18. Hughes, W. L., Painter, R. B., Quastler, H. und Sherman, F. G.
Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 476 - 483 (1958)
19. Koburg, E. und Maurer, W.
Autoradiographische Untersuchung mit ^3H -Thymidin über die Dauer der Desoxyribonucleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 61, 229 - 242 (1962)
20. Krey, U., Löhrs, U. und Eder, M.
Tumorentwicklung am Darm untersucht
Neoplastische Veränderungen mit 1,2-DMH reproduziert
Med. Trib. (Wiesb.) 21, 12 (1972)

21. Leblond, C. P., Messier, B. und Kopriwa, B.
Thymidine-³H as a tool for the investigation of
the renewal of cell populations
Lab. Invest. 8, 296 - 308 (1959)
22. Messier, B.
Renewal of the colonic epithelium of the rat
Amer. J. dig. Dis. 5, 833 - 835 (1960)
23. Messier, B. und Leblond, C. P.
Preparation of coated radioautographs by dipping
sections in fluid emulsions
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 96, 7 - 10 (1957)
24. Messier, B. und Leblond, C. P.
Cell proliferation and migration as revealed by radio-
autography after injection of thymidine-³H into male
rats and mice
Amer. J. Anat. 106, 247 - 258 (1960)
25. Oehlert, W.
Autoradiographische Untersuchungen zur Regeneration
und Kanzerisierung
Acta histochem. (Jena) Suppl. 8, 257 - 274 (1968)

26. Oehlert, W., Dörmer, P. und Lesch, R.

Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese im überlebenden Tumorgewebe des Menschen
Beitr. path. Anat. 128, 468 - 480 (1963)

27. Osswald, H. und Krüger, F. W.

Die cancerogene Wirkung von 1,2-Dimethylhydrazin beim Goldhamster
Arzneimittel-Forsch. 19, 1891 - 1892 (1969)

28. Pilgrim, C.

Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdoppelung bei verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte nach einer neuen Doppelmarkierungsmethode
Anat. Anz. 115, 128 - 133 (1964)

29. Pilgrim, C., Lennartz, K. J., Wegener, K., Hollwege, S. und Maurer, W.

Autoradiographische Untersuchungen über tageszeitliche Schwankungen des ^3H -Index und des Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Rattenfetus sowie bei Ascites-Tumorzellen
Z. Zellforsch. 68, 138 - 154 (1965)

30. Quastler, H. und Sherman, F. G.

Cell population kinetics in the intestinal epithelium
of the mouse

Exp. Cell Res. 17, 420 - 438 (1958)

31. Rogers, A. W.

Die Mikroskopie von Autoradiographien

Leitz-Mitteilungen für Wissenschaft und Technik,

Band III, Nr. 2, 43 - 47

Wetzlar 1964

32. Romeis, B.

Mikroskopische Technik

R. Oldenburg Verlag, München - Wien 1968

33. Sachs, L.

Statistische Auswertungsmethoden

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1969

34. Schauer, A., Kunze, E. und Boxler, K.

Generationszeitzyklus von 1,2-DMH induzierten Adeno-
carcinomen des Rattencolons

Naturwissenschaften 58, 221 (1971)

35. Schauer, A., Völlnagel, Th. und Wildanger, F.
Cancerisierung des Rattendarmes durch 1,2-Dimethyl-
hydrazin
Z. ges. exp. Med. 150, 87 - 93 (1969)
36. Schultze, B. und Oehlert, W.
Autoradiographic investigation of incorporation of
³H-thymidine into cells of the rat and mouse
Science 131, 737 - 738 (1960)
37. Springer, P., Springer, J. und Oehlert, W.
Die Vorstufen des 1,2-Dimethylhydrazin-induzierten-
Dick- und Dünndarm-Carcinoms der Ratte
Z. Krebsforsch. 74, 236 - 240 (1970)
38. Wegener, K. und Hollwege, S.
Autoradiographische Bestimmungen der Generationszeit
und der Dauer von Teilphasen bei fetalen Zellen der
Ratte
Anat. Anz. 115, 134 - 140 (1964)
39. Weisburger, J. H.
Colon carcinogens
Cancer (Philad.) 28, 60 - 70 (1971)

40. Wiebecke, B., Löhrs, U., Brandts, A. und Eder, M.
Vergleichende tierexperimentelle und bioptische Untersuchungen zur Morphogenese der Dickdarmpolypen
Verh. dtsch. Ges. Path. 53, 239 - 243 (1969)
41. Wiebecke, B., Löhrs, U., Brandts, A. und Eder, M.
Aussprache zum Vortrag
Verh. dtsch. Ges. Path. 53, 245 (1969)
42. Wiebecke, B., Löhrs, U., Gimmy, M. und Eder, M.
Erzeugung von Darmtumoren bei Mäusen durch 1,2-Dimethylhydrazin
Z. ges. exp. Med. 149, 277 - 278 (1969)
43. Wittig, G. und Wildner, G. P.
Zur Problematik der Dickdarm-Polypen
Dtsch. Gesundh.-Wes. 23, 817 - 825 (1968)
44. Wittig, G., Wildner, G. P. und Ziebarth, D.
Der Einfluss der Ingesta auf die Kanzerisierung des Rattendarmes durch 1,2-DMH
Arch. Geschwulstforsch. 37, 105 - 115 (1971)

Lebenslauf

Ich, Dietrich Erhard Kröhl, wurde am 8. 10. 1942 in Plauen/Vogtl. als Sohn meiner Eltern Wilhelm und Margarethe, geb. Grünewald, geboren. Dort besuchte ich ab Herbst 1949 die Volksschule. 1950 übersiedelten wir nach Heinersreuth/Obfr. und von dort 1951 weiter nach Wiesbaden. Hier ging ich ab 1955 in das Gymnasium für Jungen an der Oranienstrasse. 1960 zogen wir nach Waiblingen/Rems, wo ich am 4. 3. 1964 das Abitur ablegte. Nach der Beendigung meiner Bundeswehrzeit nahm ich zum Sommersemester 1965 in Mainz das Studium der Zahnmedizin auf. Am 31. 3. 1969 machte ich hier mein Physikum und bestand am 14. 12. 1971 das Staatsexamen. Die Bestallung erhielt ich am 17. 1. 1972 und bin seitdem als unselbständiger Assistent tätig.

Seit dem 18. 4. 1973 bin ich verheiratet.

